

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1949

THÈSE

N° 5

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jacques Louis Max POLONOVSKI

Agrégé de l'Université

Ancien Elève de l'Ecole Normale Supérieure

Né à Paris, le 9 Septembre 1920

Présentée et soutenue publiquement le 7 Janvier 1949

SUR LE VIEILLISSEMENT

DU

SÉRUM SANGUIN

Président : Monsieur le Professeur Léon BINET

L'EXPANSION SCIENTIFIQUE

FRANÇAISE

23, Rue du Cherche-Midi, PARIS-6°

1949

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : **OLONOVSKI**

N° 5

Prénoms : **Jacques-Louis-Max**

DOCTORAT EN MÉDECINE

Date de la soutenance : **7 Janvier 1949**

Numéro d'ordre : **5**

1

OLONOVSKI (Jacques - Louis - Max). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, L'Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 5).

2

OLONOVSKI (Jacques - Louis - Max). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, L'Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 5).

3

OLONOVSKI (Jacques - Louis - Max). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, L'Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 5)

4

OLONOVSKI (Jacques - Louis - Max). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, L'Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 5).

L'EXPANSION SCIENTIFIQUE

FRANÇAISE

23, Rue du Cherche-Midi, PARIS-6°

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Nom du Candidat : **POLONOVSKI**

Prénoms : **Jacques-Louis-Max**

Date de la soutenance : **7 janvier 1949**

Numéro d'ordre : **2**

2

LOUIS - MAX). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, I, Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 2).

LOUIS - MAX). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, I, Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 2).

4

LOUIS - MAX). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, I, Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 2).

LOUIS - MAX). — Sur le vieillissement du sérum sanguin. — Paris, I, Expansion Scientifique Française, 1949, in-8°, 32 pages, 4 tableaux.

(Thèse de médecine, Paris, 1949, n° 2).

3

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1949

THÈSE

N° 5

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'Etat)

PAR

Jacques Louis Max POLONOVSKI

Agrégé de l'Université

Ancien Elève de l'Ecole Normale Supérieure

Né à Paris, le 9 Septembre 1920

Présentée et soutenue publiquement le 7 Janvier 1949

SUR LE VIEILLISSEMENT

DU

SÉRUM SANGUIN

Président : Monsieur le Professeur Léon BINET

L'EXPANSION SCIENTIFIQUE

FRANÇAISE

23, Rue du Cherche-Midi, PARIS-6°



FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

TABLEAU DU PERSONNEL

DOYENS HONORAIRES

MM. BALTHAZARD, BAUDOUIN.

DOYEN

M. Léon BINET
Membre de l'Institut

ASSESSEUR

M. Jean VERNE

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUBERTIN, BALTHAZARD, BASSET, BAUDOUIN,
BRINDEAU, E. BRUMPT, CARNOT, CHEVASSU,
CHIRAY, CLERC, DELBET, GUILLAIN, HARTMANN,
HEITZ-BOYER, LAIGNEL-LAVASTINE, LAUBRY,
LEMIERRE, LHERMITTE, LOEPER, MARION,
MATHIEU, MULON, OMBRÉDANNE, ROUVIÈRE,
SANNIÉ, SÉBILEAU, SÉZARY, TANON.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	OLIVIER (E.).
Anatomie pathologique.	LEROUX (R.).
Assistance Médico-so-	
cialie	N...
Bactériologie	GASTINEL (P.).
Biologie médicale	VERNE (J.).
Chimie médicale	POLONOVSKI (M.).
Clinique de cardiologie .	DONZELOT (E.).
	BROCQ (P.).
Cliniques chirurgicales .	CADENAT (F.-M.).
	MONDOR (H.).
	QUÉNU (J.).
Clinique chirurgicale in-	
fantile et d'orthopé-	
die	N...
Clinique chirurgicale or-	
thopédique	MERLE D'AUBIGNÉ (R.).
Clinique gynécologique .	MOCQUOT (P.).
Clinique des maladies	
cutanées et syphiliti-	
ques	GOUGEROT (H.).
Clinique des maladies	
des enfants	DEBRÉ (R.).
Clinique des maladies	
infectieuses	MOLLARET (P.).
Clinique des maladies	
mentales et de l'en-	
céphale	DELAY (J.).
Clinique des maladies	
du sang	CHEVALLIER (P.).
Clinique des maladies	
du système nerveux .	ALAJOUANINE (T.).

	MM.
Cliniques médicales ..	BÉNARD (H.).
	LAROCHE (G.).
	HARVIER (P.).
	LIAN (C.).
Clinique médicale pro-	
pédeutique	P. VALLÉRY-RADOT (L.).
Clinique de Neuro-chi-	
rurgie	PETIT-DUTAILLIS (D.).
Cliniques obstétricales .	LANTUÉJOL (P.).
	LÉVY-SOLAL (E.).
	PORTES (L.).
Clinique ophtalmologi-	
que	VELTER (E.).
Clinique oto-rhino-laryn-	
gologique	LEMAITRE (F.).
Clinique physio-patho-	
logique des problèmes	
alimentaires (chaire à	
titre personnel)	RICHET (C.).
Clinique psychiatrique	
infantile	HEUYER (C.).
Clinique de puériculture	
Clinique stomatologique	
Clinique thérapeutique	
chirurgicale	SÈNÈQUE (J.).
Clinique thérapeutique	
médicale	CHABROL (E.).
Clinique de la Tubercu-	
lose	BERNARD (E.).
Clinique urologique ...	FÉY (B.).
Embryologie	GIROUD (A.).

	MM.
Histoire de la médecine et de la chirurgie ..	BARIÉTY (M.).
Histologie	CHAMPY (C.).
Hydrologie thérapeu- tique et climatologie ..	JUSTIN-BESANÇON (L.).
Hygiène et clinique de la première enfance ..	CATHALA (J.).
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (G.).
Médecine du Travail ..	DESOLLE (H.).
Médecine légale	PIÉDELIEVRE (R.).
Parasitologie et histoire naturelle médicale ..	GALLIARD (H.).
Pathologie chirurgicale	DE GAUDART D'ALLAINES (F.).

	MM.
Pathologie exotique ..	LAVIER (G.).
Pathologie expérimen- tale et comparée ...	LEMAIRE (A.).
Pathologie médicale ..	MOREAU (R.).
Pathologie et thérapeu- tique générales	DE GENNES (L.).
Pharmacologie et ma- tière médicale	HAZARD (R.).
Physiologie	BINET (L.).
Physique médicale	STROHL (A.).
Radiologie médicale ..	DESGREZ (H.).
Rhumatologie	COSTE (F.).
Technique chirurgicale ..	MOULONGUET (P.).
Thérapeutique	TURPIN (R.).

PROFESSEURS SANS CHAIRE

	MM.
Histologie	BULLIARD.
Anatomie	CORDIER.
Physique médicale	DOGNON.

	MM.
O. R. L.	HALPHEN.
Chimie médicale	JAYLE (M.).
Pharmacologie	Mlle J. LÉVY.

II. — AGRÉGÉS EN EXERCICE

	MM.
Anatomie	N... DELMAS. N... ff DEBEYRE.
Anatomie pathologique ..	DELARUE. M ^{lle} GAUTHIER-VILLARS.
Bactériologie	BONNET. FASQUELLE.
Biochimie médicale ...	ETTORI. SCHAPIRA.
Dermato-Syphiligraphie	DEGOS.
Histologie	COUIARD. DESCLAUX.
Hydrologie	DEBRAY.
Hygiène	BOYER. DEPARIS.
Médecine légale	DEROBERT.
Neurochirurgie	PUECH.
Neurologie	DE SEZE.
Obstétrique	DIGONNET. MAYER. SUREAU. VARANGOT.
Ophtalmologie	OFFRÉT.
Oto-rhino-laryngologie ..	AUBIN.
Parasitologie	BRUMPT (L.-C.).
Pathologie chirurgicale.	FEVRE. HUGUIER. LÉGER.

	MM.
Pathologie chirurgicale.	PADOVANI. PATEL. ROUX. RUDLER. SICARD. N...
Pathologie expérimen- tale	MERKLEN. BROUET. CACHERA. DECOURT. DREYFUS (Gilbert). FAUVERT. GARCIN.
Pathologie médicale ..	HAMBURGER. KOURILSKY. LAMY. LENEGRE. MARCHAL. MAURIC. SOULIÉ.
Pédiatrie	LAPLANE. MARIE (Julien).
Pharmacologie	CHEYMOL.
Physiologie	BARGETON. PARROT.
Physique médicale	DIJOURNO.
Psychiatrie	BARUK.
Thérapeutique Agr. ch. d'ens.	BROUET.
Urologie	COUVELAIRE (R.).

III. — PROFESSEURS HONORAIRES ET AGRÉGÉS RAPPELÉS A L'EXERCICE POUR LE SERVICE DES EXAMENS

MM.		MM.	
Pathologie chirurgicale.	BASSET.	Anatomie pathologique.	HUGUENIN.
Obstétrique	BRINDEAU.	Obstétrique	LE LORIER.
Clinique chirurgicale .	GATELLIER.	Obstétrique	VAUDESCAL.

IV. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE A TITRE PERMANENT

MM.		MM.	
Clinique chirurgicale ..	AMELINE.	Clinique médicale	BOULIN.
	FUNCK-BRENTANO.	Clinique obstétricale ..	ECALLE.
	MÉNEGAUX.		LACOMME.
Clinique médicale	HAGUENAU.	Clinique ophtalmologi- que	RENARD.
	MOUQUIN.		

MM.

Secrétaire de la Faculté. J. MOREL.

Secrétaire-adjoint Mlle CHAINTREUIL.

Bibliothécaire en Chef .Docteur A. HAHN.

Bibliothécaires { Mlles DUMAITRE.
GOICHON.
LAURENT.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées, doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation.

A LA MÉMOIRE DE MON GRAND-PÈRE,

MAX POLONOVSKI

A MA GRAND'MÈRE,

A MON PÈRE,

MICHEL POLONOVSKI

Membre de l'Académie de Médecine
Professeur de Chimie à la Faculté de Médecine
Officier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre

A MA MÈRE,

*en faible témoignage de mon affection,
de ma vénération et de ma reconnaissance.*

A MA FEMME,

A MES ENFANTS,

A MA FAMILLE.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR LÉON BINET
Doyen de la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie des Sciences
et de l'Académie de Médecine
Commandeur de la Légion d'Honneur

*en témoignage de gratitude pour le bienveillant
intérêt qu'il m'a manifesté pendant toute la
durée de mes études médicales, d'admiration
pour son œuvre physiologique, et de recon-
naissance pour l'honneur qu'il me fait en
acceptant de présider la soutenance de cette
thèse.*

A MON MAÎTRE

MICHEL MACHEBŒUF

Professeur de Chimie

à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de Bordeaux

Chef de Service à l'Institut Pasteur de Paris

Officier de la Légion d'Honneur

Croix de Guerre 39-45

*à qui je dois le sujet de cette thèse et
à qui je suis heureux de dire ici ma
grande admiration et ma profonde re-
connaissance.*

A MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND
Membre de l'Académie des Sciences
de l'Académie de Médecine, de Pharmacie, d'Agriculture
Professeur honoraire à la Sorbonne
Chef de service à l'Institut Pasteur de Paris

*en témoignage de profonde admiration
et en très respectueux hommage.*

A MONSIEUR JACQUES TREFOUEL
Membre de l'Académie des Sciences
et de l'Académie de Médecine
Directeur de l'Institut Pasteur

*En remerciement pour le bienveillant
intérêt qu'il m'a toujours témoigné et
en respectueux hommage.*

A MES MAÎTRES DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS,

A MES MAÎTRES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS,

A MES MAÎTRES DES HÔPITAUX DE PARIS.

A MES AMIS,

A MES CAMARADES DE L'ÉCOLE NORMALE SUPÉRIEURE
ET DE LA FACULTÉ DES SCIENCES,

A MES CAMARADES DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE,

A TOUS MES CAMARADES DE L'INSTITUT PASTEUR.

SUR LE VIEILLISSEMENT DU SÉRUM SANGUIN

INTRODUCTION

Le problème du vieillissement fait partie des grands problèmes de la biologie : dans son sens le plus général, il se confond même avec celui de l'évolution. Il représente, en effet, les modifications apportées par le temps à un système théoriquement isolé. Or, aucun système réel ne peut être isolé. Il est donc difficile de discerner le vieillissement proprement dit de l'action du milieu extérieur.

Le vieillissement est-il une caractéristique de la vie ? L'évolution cosmique nous donne l'exemple d'un vieillissement qui dépasse largement le simple cadre de notre biologie. Mais, à notre échelle, les expériences de vieillissement effectuées sur des éléments minéraux semblent limiter leurs possibilités d'évolution à une action du milieu extérieur (31) ou à une particulière instabilité nucléaire (radio-activité). C'est, au contraire, une instabilité de l'édifice macro-moléculaire (23) qui paraît à la base du vieillissement biologique.

Il ne faudrait toutefois pas oublier les possibilités d'évolution de certains composés minéraux instables, comme les pyrophosphates sodico-magnésiens, dont les transformations irréversibles rappellent étonnamment la dénaturation des protéines (CHERBULIEZ, 19).

Un être vivant naît, vit et meurt. C'est comme un acheminement vers une mort inéluctable que se présente le vieillissement des organismes vivants. Mais, après la mort, le vieillissement continue encore à transformer la matière vivante. Ce serait donc une propriété caractéristique, non de la vie, mais des édifices biochimiques.

Certains systèmes biologiques semblent cependant échapper à la loi du vieillissement. Mais ces exceptions peuvent n'être qu'apparentes : ainsi, la conservation pluriséculaire de graines ou de spores correspond simplement à une stabilité bien plus grande des édifices moléculaires déshydratés. D'autre part, les nombreuses et très belles expériences de biologistes comme ENRIQUEZ, WOODRUFF, MÉTALNI-KOFF, CARREL, etc..., ont prouvé que, par simple division, la matière vivante pouvait se perpétuer indéfiniment, comme si une portion de l'être vivant (le germe) ne subissait pas le vieillissement. Mais le problème ainsi posé est trop complexe, et il nous oblige à préciser le sens du vieillissement au sein des êtres vivants où les synthèses et les dégradations incessantes provoquent un renouvellement dynamique constant des constituants biochimiques.

De toutes façons, il est presque impossible de comparer le vieillissement de la matière vivante dans un organisme vivant au vieillissement matériel hors de toute cellule vivante : l'organisme est à même de lutter contre ce vieillissement matériel et son vieillissement propre représenté une résultante de tous les processus de dégradation, de réaction et de synthèse. Les mécanismes du vieillissement de la matière isolée interviennent sans doute dans le vieillissement des organismes, mais les théories qui s'appliquent à ce dernier doivent tenir compte de tous les autres facteurs possibles : en particulier, tant que les processus de

synthèse sont plus puissants et plus actifs que ceux du vieillissement, l'organisme ne vieillit pas.

Toutes les théories proposées pour expliquer le vieillissement des organismes représentent un aspect intéressant du phénomène : usure des tissus, diminution des processus d'oxydation, accumulation de substances toxiques, diminution de la perméabilité cellulaire, instabilité colloïdale, déshydratation et dénaturation du matériel protéique. On observe toujours à la base le processus normal de vieillissement de la matière vivante et une diminution consécutive des processus de défense de l'organisme contre l'accumulation de ces molécules vieilles (ou dénaturées).

L'étude du vieillissement du sérum sanguin peut nous éclairer sur le mécanisme du vieillissement des macromolécules biologiques. De plus, elle peut nous renseigner sur les processus de défense de l'organisme contre la tendance au vieillissement du plasma. Ce n'est pas sans raison qu'on assimile habituellement le vieillissement de l'organisme à celui du système circulatoire. Et ne pourrait-on pas considérer l'infiltration des artères et des artérioles (athéromes, athérosclérose) comme une résultante de ces modifications du plasma contre lesquelles l'organisme n'arrive plus à lutter ?

L'étude des modifications subies *in vitro* par le sérum aura donc le double intérêt théorique de nous apporter des éclaircissements sur le vieillissement de la matière vivante, en général, et peut-être sur les moyens de lutte dont dispose l'organisme *in vivo*.

Pratiquement, enfin, cette étude intéresse l'industrie des sérums thérapeutiques dont les difficultés de conservation sont une cause de pertes considérables. Il est également possible que les mêmes conclusions soient applicables au vieillissement d'autres matériaux biologiques conservés aseptiquement.

HISTORIQUE

Quel que soit le mode de conservation aseptique du sérum sanguin en ampoules, on voit tôt ou tard apparaître un précipité blanc. Celui-ci est une des manifestations visibles des modifications certaines du sérum au cours du vieillissement.

Alors que, sur les modifications physico-chimiques du sérum, on relève de nombreuses observations, la littérature est, au contraire, assez pauvre en ce qui concerne l'étude du précipité.

Ce précipité n'était pas pourtant passé inaperçu : il en est fait mention dans un certain nombre de publications touchant le vieillissement des sérums conservés.

OKER-BLOM (42) en 1900, S. BACHER (4) en 1924, L. PETSCHACHER (62) en 1925, KIYOTAKI (cité par BECHHOLD (6) en 1935), D. BROCC-ROUSSEU et G. ROUSSEL (15) en 1933, W. KOPACZEWSKI (31) en 1938 signalent cette modification du sérum vieilli, sans se préoccuper de sa nature ni de son origine.

Seuls, A. ROCHE et F. MARQUET en France (1935) et KHABAS en URSS (1936) ont publié une analyse du précipité.

Il convient cependant de signaler que, dès 1900 (35 ans auparavant), M. Gabriel BERTRAND s'était intéressé à ce problème : travaillant à l'Institut Pasteur, il avait effectué l'analyse chimique du précipité. De plus, ayant fait l'hypothèse que les modifications observées étaient dues à l'action d'une diastase, il chercha à en prévenir les effets : se fondant sur ses travaux antérieurs concernant le rôle

des métaux et, en particulier, du calcium dans les phénomènes diastatiques, il eut l'idée d'inhiber cette réaction par l'addition d'oxalate pour éliminer le calcium. L'expérience a d'ailleurs justifié ses conceptions ; et, appliquée pendant de nombreuses années à l'Institut Pasteur, la méthode a fait ses preuves. Malheureusement, ces recherches ne furent pas publiées et, après un certain temps, on négligea de suivre la technique d'élimination du calcium dans les sérums thérapeutiques.

Nous ignorions donc ces travaux de M. Gabriel BERTRAND au moment où nous fîmes nos propres recherches, en 1944. Ce n'est qu'au moment où nous publiions nos résultats [pli cacheté à l'Académie des Sciences, 1944 (45)], que G. BERTRAND rendit publiques ses découvertes (9). Et c'est pour nous une précieuse garantie que l'accord entre nos résultats et les siens. Il a, en effet, constaté la présence de savons calciques d'acides palmitique et stéarique, de phosphates de calcium et de petites quantités d'autres substances (cholestérol, etc...).

Les résultats de A. ROCHE et F. MARQUET (48) qui, jusqu'ici, sont les seuls connus, présentent, au contraire, avec les nôtres, des divergences que nous soulignerons. La composition du précipité isolé par ces auteurs était la suivante :

Lipides totaux : 18,8 p. 100	Cholestérol, 5,2 p. 100 des lipides.
	Phosphore, 15,7 p. 100 des lipides.
	Azote, 0,61 p. 100 des lipides.
Résidu : 81,2 p. 100	Cendres, 29,9 p. 100 du total.
	Subst. organiques, 51,3 p. 100 (N : 4 %).
Compositions des cendres	Calcium, 39,4 p. 100.
	Phosphore, 9,4 p. 100.
	Carbonates, présence.

En conclusion, le précipité contenait principalement des phosphatides de
N
calcium ($\frac{N}{P} > 25$) et des protéines.

Les travaux de KHABAS (28) ont porté sur des sérums conservés en présence de chloroforme. Peut-être ce fait explique-t-il les différences entre ses observations et les nôtres. Il conclut à la présence de grandes quantités de lipides, de matières minérales (cendres, 22,3 p. 100) et de très petites quantités de protéines (4,2 à 4,35 p. 100) (*).

Les modifications physico-chimiques et immunologiques que subit le sérum en vieillissant ont bien souvent attiré l'attention des chercheurs. Ce sont tout d'abord les constantes physiques dont on a mesuré les variations au cours du temps :

— la conductibilité électrique diminue de façon assez sensible [G. BUGLIA (16), W. KOPACZEWSKI (31)].

— la tension superficielle s'abaisse de plus de 10 dynes/cm. [P. LECOMTE DU NOUY (35), W. KOPACZEWSKI (31)].

(*) Il nous faut ajouter un travail tout récent (1948) de M. KOPACZEWSKI et M. PIETTRE (32) qui apportent une confirmation à nos propres recherches : ces auteurs indiquent la présence, dans le précipité obtenu après 13 ans de vieillissement, de 36 p. 100 de savons de calcium et de 64 p. 100 de protéides.

— le pH, qui commence par diminuer légèrement durant les premières années, remonte ensuite et peut dépasser sa valeur initiale [W. KOPACZEWSKI (31, 32)].

— le pouvoir moussant diminue nettement [F. TAYEAU (63)].

Toutes ces modifications sont liées à celles du système protidique et lipido-protidique du sérum.

La plupart des techniques utilisables dans l'étude des protéines sériques montrent des variations importantes dans leurs grandeurs moléculaires (64, 67).

A l'ultra-microscope, E. SALEN (50) met en évidence la formation d'aggrégats moléculaires. Par ultracentrifugation, P. VON MUTZENBECHER (41) démontre la possibilité pour les globulines sériques de s'agglomérer, d'une part, et de se scinder, d'autre part en fragments de poids moléculaire très bas (35.000). A. ROCHE et J. BRACCO (47), par des mesures de pression osmotique, arrivent aux mêmes conclusions et insistent sur le rôle de la température dans l'orientation, soit vers la scission, soit vers l'agglomération.

Dans des réactions d'interprétations plus délicates, W. KOPACZEWSKI (31), par la possibilité de gélifier les protéines sériques par l'acide lactique, trouve également des modifications touchant les dimensions moléculaires.

Les modifications des liaisons entre lipides et protéines nous paraissent spécialement intéressantes. A part un travail de M. MOUSSERON et H. HUC (40), montrant une augmentation des lipides liés aux globulines, tous les travaux sur ce sujet ont été effectués par M. MACHEBEUF et ses élèves [DELAGE (20), TAYEAU (55, 56)].

Grâce à leurs techniques de délipidation, ils purent mettre en évidence un accroissement considérable de la stabilité des cénapses lipidoprotéidiques au fur et à mesure que le sérum vieillit. Le passage dans l'éther des lipides sériques nécessite une concentration en alcool et un temps de contact d'autant plus élevés que le sérum est plus vieux. Le même phénomène se produit vis-à-vis du décollement des lipides par les savons, du décollement du cholestérol par les saponosides.

Les réactions sérologiques et immunologiques sont également modifiées au cours du vieillissement. Or, on sait le rôle joué par les cénapses lipidoprotéiniques en immunochimie. Il est donc possible de trouver un lien entre ces diverses modifications. Rappelons l'instabilité du complément, l'augmentation de la floculabilité dans certaines séro-réactions [A. VERNES (57), R. DOURIS (21), A. BRETON (13), etc...].

Il peut être utile de comparer l'action du vieillissement à l'action du chauffage sur le sérum : alors que, dans certains cas, ces deux facteurs semblent agir dans le même sens (le chauffage à 55° accélère les modifications ultérieures du sérum conservé, diminue l'extractibilité des lipides par l'éther en présence d'alcool (39), détruit le complément, etc...), on a souvent remarqué, au contraire, qu'ils ont des effets opposés : V. HENRI (25), A. ROCHE et J. BRACCO (47), P. VON MUTZENBECHER (41) montrent que le chauffage tend à grossir et agglomérer les molécules protéiniques, alors que le vieillissement à froid aurait plutôt l'effet inverse. A. VERNES (57), R. DOURIS (22), par leurs réactions sérologiques, trouvent également des modifications inverses.

Si toutes ces modifications du sérum ont généralement été interprétées comme des dégradations physiques irréversibles du système colloïdal, nous devons faire une place spéciale aux transformations diastatiques possibles au sein du sérum, qui pourraient les expliquer pour une grande part : rappelons qu'une telle hypothèse avait été faite dès 1900 par M. Gabriel BERTRAND bien avant que l'on ait mis en évidence les systèmes diastatiques du sérum. C'est à E. LE BRETON

et J. PANTALÉON (33, 34) qu'on doit l'étude de l'action lécithinasique et cholestéroléstérasique du sérum. Ces auteurs ont montré que le sérum isolé et maintenu à 37 degrés subit une hydrolyse progressive de ses phosphatides, tandis que les acides gras libérés se fixent sur le cholestérol libre grâce à la cholestéroléstérase de SPERRY (53, 54).

Nous verrons quel rôle on peut attribuer à ces diastases dans les modifications observées au cours du vieillissement du sérum.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Lorsqu'on conserve aseptiquement du sérum sanguin en ampoules, il se trouble au bout d'un certain temps (quelques semaines), puis un précipité se dépose à la longue. C'est par milliers que les vieilles ampoules contenant un tel précipité sont considérées comme inutilisables et rendues chaque année à l'Institut Pasteur.

Notre travail a porté principalement sur l'étude du précipité. Nous avons ensuite cherché quelle pouvait être l'origine de ce précipité, par quelques expériences sur le sérum surnageant.

Etude du précipité

I. — Isolement du précipité.

Le sérum sanguin dont nous nous sommes servis était du sérum de cheval. Nous avons, en effet, disposé d'une abondante quantité d'ampoules de sérums périmés de l'Institut Pasteur. Nous avons essentiellement utilisé les sérums antipneumococcique et antigangréneux (datant de 1939 à 1941).

Ces sérums sont tyndalisés à 56° lors de leur préparation. Nous avons vérifié que ce traitement n'est pas responsable des modifications ultérieures du sérum : en effet, des ampoules de sérum de lapin non tyndalisées, préparées par nous-mêmes, se sont comportées à peu près exactement comme les sérums thérapeutiques de l'Institut Pasteur : le précipité était seulement un peu moins abondant. Nous verrons plus loin l'importance que peut avoir la tyndalisation à 56° sur l'équipement enzymatique du sérum et ses répercussions possibles sur le vieillissement du sérum.

Il est aisé de recueillir le précipité par décantation de la plus grande partie du sérum, puis centrifugation à grande vitesse (6.400 t/min.). Le précipité ainsi obtenu contient du sérum, qu'il convient d'éliminer totalement par plusieurs lavages. Nous avons remis le culot en suspension dans une solution saline isotonique au sérum et contenant une quantité d'ions calcium comparable à celle du sérum, pour éviter une dissolution possible du précipité riche en sels de calcium ($\text{ClNa} : 9 \text{ g.}$ $\text{ClCa} : 0,3 \text{ g.}$ $\text{H}_2\text{O dist. q. s. p. 1 litre}$).

On centrifuge le précipité ainsi lavé. On recommence un tel lavage plusieurs fois. On termine par un lavage à l'eau distillée. Les centrifugations sont difficiles du fait de la densité du précipité peu différente de 1.

II. — Propriétés du précipité.

Le précipité se présente alors sous forme d'une pâte blanche. En suspension dans l'eau (ainsi que dans le sérum initial), il donne lieu à la formation d'ondes moirées quand on agite la suspension. Ce phénomène est dû à la présence d'éléments cristallins en aiguilles. Observé au microscope, le précipité montre de fines aiguilles entourées d'une substance amorphe et de quelques gouttelettes lipidiques. Le microscope polarisant confirme la présence de cristaux anisotropes en aiguilles.

Insoluble dans l'eau, il ne se dissout ni dans les acides ni dans les alcalis.

L'éther n'en arrache qu'une très faible fraction. L'alcool en dissout une fraction plus importante.

Par calcination, le précipité brûle en laissant des cendres abondantes. Ceci nous montre la présence de matériaux organiques contenant une forte proportion d'éléments minéraux.

Nous en avons effectué une analyse élémentaire, puis nous l'avons fractionné pour en individualiser les constituants.

III. — Analyse élémentaire.

1. *Le spectre d'émission* nous a permis d'identifier qualitativement et même semiquantitativement quelques éléments minéraux du précipité total (*).

Ca +++ (abondant).

Si + (présence).

Fe (présence en petite quantité).

Nous avons également noté l'absence totale de magnésium. Le seul cation présent en quantité importante est donc le calcium ; il n'est accompagné que de traces de fer.

2. Dosage chimique de quelques éléments.

a) Azote.

La méthode de KJELDAHL pour le dosage de l'azote contenu dans 14 mg. de précipité sec donne $n = 2,4 \text{ cm}^3$ de SO_4H_2 N/100, soit $N = 2,4 \text{ p. } 100$.

Le précipité contient donc 2,4 p. 100 d'azote.

b) Phosphore.

La minéralisation de 4,2 mg de précipité sec donne par la technique de dosage colorimétrique (38) une teneur de 24,5 μg de P.

Témoin blanc sans P : 16 (graduation Meunier)

Témoin étalon 25 μg P. : 128.

4,2 mg de précipité : 126.

La teneur en phosphore du précipité est donc 0,58 p. 100.

(*) Nous sommes heureux de pouvoir remercier ici M. D. BERTRAND, dont l'amitié nous est précieuse et à qui nous devons cette étude spectrographique.

c) Calcium.

La méthode manganométrique effectuée sur les cendres de 61,5 mg de précipité ont fourni les chiffres suivants :

MnO_4K : 1,90 cm³, soit Ca : 3,8 mg.

La teneur en calcium du précipité est donc 6,2 p. 100.

d) Carbonates.

La méthode de dosage au moyen de l'appareil de Warburg nous a permis de doser la teneur du précipité en carbonates.

Témoin blanc	2 mm.
200 μg CO_3Ca	22,5 mm.
500 μg CO_3Ca	50,5 mm.
1.000 μg CO_3Ca	95 mm.
14 mg de précipité	38 mm.

14 mg de précipité dégagent autant de CO_2 que 375 μg CO_3Ca .

La teneur du précipité en CO_2 est donc 1,19 p. 100.

Exprimée en carbonate de calcium, la teneur du précipité est 2,7 p. 100.

3. Cendres.

La calcination au rouge sombre de 82 mg de précipité sec dans une capsule de platine a donné un résidu de 14,2 mg de cendres.

Les cendres représentent donc 17,3 p. 100 environ du précipité.

IV. — Fractionnement du précipité.

Ayant centrifugé 4 litres de sérums antigangréneux et antipneumococcique vieux de quatre ans, nous avons recueilli 367 mg de précipité. (Nous désignons par E un échantillon de 320 mg de ce précipité). Il représente donc 0,092 mg par cm³ de sérum. C'est sur un échantillon de même origine que nous avons effectué les dosages précédents.

Nous avons fractionné le précipité E. Nous nous sommes guidés sur l'aspect microscopique hétérogène, pour séparer les constituants. Nous avons d'abord dissous les gouttelettes huileuses dans l'éther en milieu neutre. L'éther s'empare d'une fraction que nous numérotions F I. Ensuite, nous fondant sur l'hypothèse de A. ROCHE et F. MARQUET, selon laquelle le précipité contiendrait surtout des phosphatides de calcium, nous avons extrait par l'éther en milieu acide une deuxième fraction F II, qui devait théoriquement, contenir les acides phosphatidiques. On constate d'ailleurs que cette extraction est suivie d'un éclaircissement notable de la phase aqueuse. L'éther devient acide : il s'est donc emparé d'une fraction importante du précipité E. Au microscope on constate la disparition des cristaux en aiguilles : ces aiguilles ont été décomposées par l'acide chlorhydrique.

La phase aqueuse acide étant encore trouble, nous en avons séparé par centrifugation le résidu insoluble (Fraction F III). Il reste alors dans la phase aqueuse tout ce qui a été dissous par ClH : nous en avons encore isolé ce qui précipite par neutralisation par la soude. Le précipité ainsi obtenu est centrifugé (Fraction F IV). Nous avons appelé fraction F V ce qui reste

solubilisé dans l'eau en milieu alcalin après toutes ces opérations : cette fraction contient sans doute la base libérée des acides éthérosolubles.

Nous allons examiner et analyser chacune de ces cinq fractions.

Fraction F I lipidique éthérosoluble.

Fraction F II acide éthérosoluble.

Fraction F III amorphe insoluble.

Fraction F IV soluble dans l'eau en milieu acide, insoluble en milieu neutre.

Fraction F V soluble : bases des acides éthérosolubles.

Fraction F I.

Obtenue par extraction directe par l'éther, elle ne laisse, après évaporation de l'éther, qu'un minime résidu gras.

Pondéralement, elle représente 3,5 mg, soit environ 1 p. 100 de E.

Nous y avons dosé le phosphore (38) et le cholestérol (37).

Phosphore : 0.

Cholestérol : 28 p. 100, soit 1 mg ou 0,28 p. 100 de E.

Il s'agit donc d'une toute petite fraction lipidique dépourvue de lipides phosphorés, contenant un peu de cholestérol.

Fraction F II.

Le précipité E, ainsi partiellement délipidé, est mis en suspension dans de l'eau acidulée par ClH et on agite cette suspension avec de l'éther. Après décantation, on traite la phase aqueuse avec une nouvelle portion d'éther. Les éthers rassemblés sont évaporés dans une capsule tarée. La fraction F II ainsi obtenue se présente sous l'aspect de jolis cristaux blancs, onctueux.

Son poids est de 198 mg. Elle représente donc environ 62 p. 100 de E. C'est, par conséquent, la fraction principale.

Ces cristaux sont insolubles dans l'eau, mais solubles dans les solvants organiques (éther, chloroforme). Chauffée, cette fraction fond à une température assez basse (50° C), puis elle brûle sans laisser de cendres. Il s'agit donc d'acides organiques.

Le dosage de phosphore, à notre surprise, nous a montré l'absence totale de phosphore dans F II. L'hypothèse d'acides phosphatidiques se trouve donc complètement éliminée.

Tout fait, au contraire, penser qu'il s'agit d'acides gras.

Nous en avons mesuré le *poids moléculaire moyen* : il se place entre celui de l'acide palmitique et celui de l'acide stéarique (technique de M. FAURE) (61).

ACIDE GRAS	POIDS MOLÉCUL.	POIDS UTILISÉ	N CM ³ NaOH (*)
Ac. palmitique	256	20 mg.	1,32
Ac. stéarique	284	20 mg.	1,20
Ac. analysé	X	20 mg.	1,25

(*) Nous avons retiré du nombre de cm³ le chiffre correspondant au témoin blanc.

Nous en déduisons le poids moléculaire moyen de ces acides qui est environ 271-272.

L'indice d'iode, effectué selon la technique de CHARGAFF (18), s'est avéré rigoureusement nul.

Il s'agit donc d'acides gras saturés dont le poids moléculaire moyen correspond à un mélange d'acides stéarique et palmitique.

Fraction F III.

Cette fraction représente la partie amorphe de E, insoluble dans l'eau même en milieu acide. Recueillie par centrifugation, lavée et séchée, elle se présente sous un aspect blanc grisâtre, car c'est là que se rassemblent les quelques poussières présentes.

Son poids est de 55 mg, soit environ 17 p. 100 de E.

Cette fraction se dissout difficilement par chauffage en milieu alcalin.

Nous y avons dosé l'azote (KJELDAHL) dont la teneur est de 11,2 p. 100.

Cette haute teneur en azote fait penser à des protéides dénaturés. La fraction F III donne effectivement des réactions positives avec l'acide nitrique (réaction xanthoprotéique) et avec le réactif de MILLON. Cette teneur en azote est cependant un peu faible pour des protéines pures ; elle correspond à peu près à 70 p. 100 de protéines. Il s'agit donc de cénapses, sans doute protéinolipidiques.

On décèle d'ailleurs la présence de cholestérol en très petite quantité (1 ou 2 mg), de phosphore (75 μ g, soit 0,14 p. 100, qui correspondent à environ 1,8 mg de phospholipides), et surtout la présence d'éléments minéraux :

Teneur en cendres : 6 p. 100.

Cette fraction F III, peu abondante, représente donc des protéines dénaturées contenant une notable proportion de lipides et d'éléments minéraux.

Fraction F IV.

La solution acide laisse précipiter, après neutralisation par la soude, une très petite fraction F IV. Centrifugée et lavée, elle pèse 24 mg, soit 7,5 p. 100 de E.

Au microscope, elle se présente sous l'aspect de petits cristaux mal formés, anisotropes.

Ces cristaux ne fondent, ni ne brûlent par chauffage. C'est à peine si on note un léger brunissement à 300°. Il s'agit donc essentiellement de sels minéraux, solubles en milieu acide, insolubles en milieu alcalin.

Nous avons effectué une analyse qualitative puis quantitative de cette petite fraction :

Qualitativement, nous avons tout d'abord noté la présence de calcium en abondance, de carbonates, de phosphates et de très petites quantités de silice, de fer, de bore et de matières organiques. Certains de ces éléments peuvent

venir d'une attaque du verre neutre boraté des ampoules (borate, silicate) : nous avons décelé la présence du bore par la méthode si sensible de G. BERTRAND et H. AGULHON, à la flamme au fluorure de bore (10).

Qualitativement, les dosages nous ont fourni les chiffres suivants :

p. 100 de F IV		
P total	7,5	soit environ 41,5 p. 100 $\text{PO}_4\text{HCa } 2\text{H}_2\text{O}$
P minéral.....	7,5	
N	0,75	5 p. 100 protéines.
B	<0,1	<1 p. 100 borates.
SiO_2	1 à 2	2 p. 100 silicates.
CO_2	11,6	26,5 p. 100 carbonates.
Ca	34	
Fe	1 à 2	
Mg	0	

La fraction F IV contient donc essentiellement des phosphates et des carbonates de calcium. Une certaine proportion de chaux libre semble même accompagner ce précipité. Notons que la quasi totalité du phosphore de E se retrouve dans F IV à l'état de phosphate minéral. Ceci confirme encore l'absence d'acides phosphatidiques dans le précipité E.

Le dosage des carbonates donne un résultat plus faible que dans E ceci s'explique aisément du fait du passage en milieu acide.

Fraction F V.

Cette dernière fraction, qui reste soluble après toutes ces manipulations, contient des éléments en très petite quantité.

Elle renferme une grande partie du calcium provenant des sels d'acides gras, libérée en milieu acide : elle contient donc chaux et phosphate de calcium à saturation de la solution aqueuse. :

P : 110 μg , soit 0,62 mg de phosphate de calcium ou 6 p. 100 du phosphore total de E.

Ca : 11 mg, soit 56,5 p. 100 du calcium total de E.

Elle renferme également une petite quantité de protéines.

N : 0,8 mg, soit 10 p. 100 de l'azote total de E ou 5 mg de protéines.

Si nous calculons le poids de cette fraction par différence ($\text{E} = 320 \text{ mg}$; $\text{F I} + \text{F II} + \text{F III} + \text{F IV} = 281 \text{ mg}$), nous obtenons 39 mg. Il reste donc encore une certaine quantité de substances non déterminées dans la fraction F V.

V. — Bilan pondéral du précipité E.

Nous pouvons récapituler en un tableau d'ensemble les teneurs des diverses fractions en les principaux éléments : calcium, acides gras, protéines (azote $\times 6,25$), phosphates ($\text{PO}_4\text{HCa } 2\text{H}_2\text{O}$), carbonates (CO_3Ca).

	POIDS		CALCIUM		ACIDES GRAS		PROTÉINES		PHOSPHATE Ca		CARBONATE Ca		CHOLESTÉROL	
	% E	mg.	% E	mg.	% E	mg.	% E	mg.	% E	mg.	% E	mg.	% E	mg.
F I ...	1	3,5	0	0	—	—	—	—	0	0	0	0	0,3	1
F II ..	62	198	0	0	62	198	0	0	0	0	0	0	0	0
F III .	17	55	—	—	—	—	12,5	40	—	—	—	—	0,6	2
F IV ..	7,5	24	2,65	8,15	—	—	0,35	1,1	3,08	9,85	2	6,35	—	—
F V ...	12,5	39 (?)	3,5	11	—	—	1,56	5	0,19	0,62	—	—	—	—
E	100	320	6,2	20	62	198	15	48	3,22	10,4	2,7	8,65	1	3,2

Ce tableau nous montre que notre fractionnement nous a permis de séparer effectivement les divers constituants du précipité : lipides, acides gras, protéines, sels minéraux. La composition du précipité est donc la suivante :

Savons de calcium	66,6 p. 100
Protéines dénaturées	15 p. 100
Phosphate de calcium	3,2 p. 100
Carbonate de calcium	2,7 p. 100
Lipides, cholestérol	5 p. 100
Autres éléments	<7 p. 100
(Silicates, borates, sels de fer, etc).	

VI. — Conclusion sur la nature du précipité.

Contrairement à ce qu'on admettait jusqu'ici, le précipité formé au cours du vieillissement du sérum sanguin, ne contient pas de sels d'acides phosphatiqués

Il est essentiellement constitué (2/3) par des sels de calcium d'acides gras saturés (palmitate et stéarate de calcium) cristallisés en fines aiguilles blanches anisotropes. Le dernier tiers comprend à peu près par moitié des protéides dénaturés et des sels minéraux : phosphates et carbonates de calcium. Nous avons noté la présence de sels de fer, de silicates et même de borates. Il contient enfin une petite proportion de lipides (5 p. 100).

Etude du sérum surnageant

Les modifications physico-chimiques, qui accompagnent le vieillissement du sérum, ayant déjà été étudiées par de nombreux auteurs, nous avons cherché quelles étaient les modifications responsables de la précipitation. Nous nous sommes donc tourné vers les modifications de composition chimique du sérum vieilli.

I. — Carbonates.

La précipitation d'une certaine quantité de carbonate de calcium pouvait provenir d'une diminution du taux des bicarbonates avant sa mise en ampoules. Aussi avons-nous dosé les carbonates (réserve alcaline) dans le sérum ainsi mis en ampoules.

La mesure est faite dans l'appareil de VAN SLYKE qui permet l'estimation volumétrique du gaz carbonique dégagé par 1 cm³ d'acide sulfurique dilué, agissant sur 1 cm³ de sérum.

Sérums frais et sérums récemment mis en ampoules nous ont donné des chiffres variant de 45 à 60 volumes (pour 100 de sérum), soit de 0,84 à 1,00 mg de CO₂ par cm³.

Les sérums vieillis (7 ans et 8 ans) ont donné des résultats analogues : de 47 à 51 volumes (ces dosages ont été effectués par M. PELOU que nous remercions vivement).

Nous n'observons donc pas un appauvrissement notable en carbonates.

II. — Phosphates minéraux.

Le dosage des orthophosphates minéraux nous a, au contraire, montré une notification nette.

Nous avons opéré sur le filtrat trichloracétique de 0,5 cm³ de sérum : en ajoutant directement les réactifs (molybdate, sulfite et hydroquinone) on obtient une coloration correspondant aux orthophosphates minéraux libres.

Phosphore du sérum frais 36 µg/cm³ de sérum.

Phosphore du sérum vieilli (4 ans) 47 µg/cm³ de sérum.

(Notons que le phosphore du précipité correspond à 0,5 µg/cm³).

Nous observons une nette augmentation des phosphates minéraux. Cette modification étant nécessairement liée à une diminution des autres formes du phosphore, nous avons recherché les teneurs en phosphore lipidique et en phosphore hydrosoluble hydrolysable.

III. — Phosphates hydrolysables ou organiques.

Sur le défécât trichloracétique, la minéralisation par les acides sulfurique et nitrique permet le dosage de tout le phosphore hydrosoluble (phosphore minéral + phosphore organique) :

Sérum frais 45 µg/cm³

Sérum vieilli 49 µg/cm³

L'augmentation est ici moins nette : le vieillissement s'est accompagné d'une hydrolyse des esters phosphoriques hydrosolubles.

P. des esters hydrosolubles du sérum frais 9 µg/cm³

P. des esters hydrosolubles du sérum vieilli 2 µg/cm³

Le phosphore lipidique a également diminué légèrement. Dans le même échantillon de sérum que précédemment, nous avons trouvé :

P. lipidique du sérum frais 30 µg/cm³

P. lipidique du sérum vieilli 25 µg/cm³

Les phospholipides ont donc pu subir une hydrolyse partielle, mais nettement moins importante que celle des esters hydrosolubles.

Quelle est la nature de ces esters hydrosolubles ? Il est possible que les dérivés phosphorylés du métabolisme glucidique en fassent partie (hexose-phosphates, phosphoglycérates, glycérphosphates, etc.). Mais il est également possible qu'on y trouve des composés polyphosphoriques (diphosphates, tri-

phosphates et esters di ou triphosphoriques dont on connaît l'instabilité *in vitro* ; cette instabilité serait peut-être capable d'expliquer à elle seule les modifications observées.

Cependant, en essayant de titrer ces dernières formes de phosphates par une hydrolyse simple (au lieu d'une minéralisation totale), nous n'avons pas réussi à les mettre en évidence en quantité notable.

Ayant déféqué du sérum frais et du sérum vieilli par un égal volume d'acide trichloracétique, nous avons traité 1 cm³ de filtrat directement par les réactifs pour doser les orthophosphates libres. D'autre part, nous avons effectué une hydrolyse de 1 cm³ de filtrat au bain-marie à l'ébullition durant 10 minutes en présence de 0,3 cm³ d'acide sulfurique et 5 cm³ d'eau. Enfin, nous avons minéralisé 1 cm³ de filtrat par le mélange sulfonitrique. Les résultats du dosage colorimétrique de phosphore ont été les suivants :

EXPRIMÉS PAR CM ³ DE SÉRUM	SÉRUM FRAIS	SÉRUM VIEILLI
P. des orthophosphates	36 µg	53 µg
P. des phosphates hydrolysables...	38 µg	53 µg
P. des phosphates minéralisables..	44 µg	55 µg

Ces résultats nous montrent qu'une hydrolyse de 10 minutes à 100° est insuffisante pour libérer cette fraction phosphorique du sérum frais : il n'apparaît ainsi que 2 µg sur 8 µg.

En résumé, nous avons constaté l'apparition dans le sérum vieilli d'ions phosphates minéraux provenant de l'hydrolyse de composés organiques.

Interprétation

Avant de chercher la cause de la précipitation, il est utile de retrouver l'origine dans le sérum des constituants du précipité.

A part les traces de silicates et de borates qui proviennent sans doute d'une attaque du verre neutre des ampoules, tous les éléments du précipité existent normalement dans le sérum : calcium, phosphates, carbonates, savons (24), protéines, lipides. Aussi, est-il suggestif de récapituler en un tableau les teneurs normales du sérum frais en ces divers constituants ainsi que celles du précipité étudié :

PAR LITRE DE SÉRUM	SÉRUM FRAIS		PRÉCIPITÉ (92 mg)	
	EN	MG. EN MOL. OU AT. G	EN	MG. EN MOL. OU AT. G
Calcium total	100	2,5	5,7	0,14
Calcium ionisé	40	1		
Carbonates (en CO ₂)	1.000	22,7	1,10	0,025
Phosphates minéraux (en P ₂ O ₅) ..	87	0,61	1,22	0,0086
Phosphates dans sérum vieilli ..	114	0,80		
Acides gras libres	270	1	57	0,21
Protéines	80.000		13,8	
Lipides	4.500		4,7	

Il apparaît nettement que tous les constituants du précipité existent dans le sérum en quantité infiniment supérieure. La précipitation ne correspond donc pas à l'apparition dans le sérum de constituants nouveaux.

On a d'ailleurs, depuis bien longtemps, constaté qu'il est impossible de mettre en solution les divers constituants minéraux du sérum en l'absence des protéines : H. M. ADLER (1) ayant préparé une solution aqueuse de ClK , Cl_2Ca , Cl_2Mg , ClNa , PO_4HNa et CO_3HNa , aux concentrations habituelles du sérum, observe une précipitation de phosphate et carbonate de calcium (voir aussi A. C. KUYPER (66)). Il en est de même d'un mélange de savons et de chlorure de calcium.

Il suffit de rappeler la solubilité des constituants du précipité pour comprendre qu'ils sont maintenus en solution dans le sérum grâce aux liaisons complexes qui les unissent aux protéines et aux lipides :

	SOLUBILITÉ DANS L'EAU	CONCENTRATION PAR LITRE DE SÉRUM FRAIS
PO_4HCa , $2\text{H}_2\text{O}$	200 mg./litre	211 mg.
Palmitate de calcium	30 mg./litre	} 250 mg. à 300 mg.
Stéarate de calcium	40 mg./litre	
(Oléate de calcium)	400 mg./litre	

On observe, en effet, que l'addition d'un sel libre, tel que phosphate, savon ou sel de calcium, est capable de troubler le sérum.

Quelles hypothèses pouvons-nous envisager pour expliquer la précipitation spontanée des constituants du sérum ?

Les anciennes hypothèses bâties sur l'existence dans le précipité d'acides phosphatidiques (dont l'origine était problématique), se trouvent aujourd'hui sans fondement. Il ne s'agit pas d'acides phosphatidiques, mais seulement d'acides gras et on sait que le sérum en contient une certaine quantité.

Nous pouvons envisager, en première hypothèse, que ces sels de calcium préexistants précipitent par simple variation de conditions physiques. L'instabilité des solutions colloïdales [DUCLAUX (23), ROCASOLANO (46)], provoquerait l'ouverture de liaisons, libérant des ions précipitables, dénaturant les protéines, etc... La précipitation des protéines et de cénapses lipidoprotéiniques peut ainsi trouver une explication satisfaisante. La conservation de protéines *in vitro* en solution donne d'ailleurs lieu à une légère dénaturation progressive et à une insolubilisation partielle. On a suggéré que l'étalement à l'interface eau-air pourrait être responsable d'une telle transformation irréversible. La précipitation des savons de calcium et des sels minéraux trouverait donc sa cause dans la dénaturation de cénapses et serait due, soit à une libération de sels précipitables, soit à un entraînement dans une précipitation simultanée avec les protéines, soit à tout autre changement dans les conditions physiques du milieu.

L'instabilité colloïdale serait donc seule à l'origine du vieillissement du sérum et de la précipitation (*).

D'autres hypothèses sont cependant vraisemblables, au moins en ce qui concerne le précipité de savons et de sels minéraux.

Le sérum nous apparaît comme à peu près saturé en ces sels de calcium peu solubles : ceci explique le dépôt si aisé de ces constituants dans tous les processus de calcification *in vivo* ; ceci explique aussi qu'un accroissement en l'un des constituants puisse *in vitro* provoquer la précipitation. Il est possible qu'un tel accroissement au sein du sérum soit à l'origine du précipité spontané des sérums vieillis.

Nous avons montré que le vieillissement s'accompagnait de l'hydrolyse de composés phosphorés organiques : esters hydrosolubles et, dans une moindre mesure, phospholipides. Il apparaît ainsi des ions phosphates supplémentaires capables de précipiter avec le calcium : la concentration en phosphate de calcium s'élève de 211 mg environ à 276 mg/litre (dépassant largement le seuil de solubilité égal à 200 mg/litre).

Cette explication, valable pour les phosphates, peut l'être aussi pour les savons : l'hydrolyse de phospholipides fait apparaître des anions gras capables de précipiter avec le calcium. Il n'est même pas indispensable que le taux des savons augmente : le simple remplacement d'acides gras non saturés (dont les sels de calcium sont assez solubles) par des acides gras saturés peut rendre compte de la précipitation. Ce remplacement peut se faire, par exemple, par échange d'acides gras.

L'apparition de constituants précipitables tels que phosphates ou acides gras est susceptible de relever de deux mécanismes : soit une hydrolyse diastasique, soit une simple décomposition due à l'instabilité des combinaisons (instabilité des polyphosphates, échange d'acides gras). L'hypothèse d'une réaction diastasique trouve des arguments dans la découverte de phosphatases, de lécithase, de cholestérol estérase dans le plasma. Ces diastases ont pour effet d'hydrolyser les esters phosphoriques (49) et les phospholipides, libérant des ions phosphates et des acides gras et, d'autre part, de synthétiser des esters de cholestérol à partir des acides gras ainsi libérés et du cholestérol libre [E. LE BRETON et J. PANTALÉON (34)]. L'apparition transitoire d'acides gras libres peut suffire à expliquer la précipitation des savons de calcium, par substitution d'acides gras saturés aux acides gras non saturés libres préexistants.

Il faut, cependant, noter que le chauffage préalable du sérum à 56°-58° détruit la lécithase décrite par E. LE BRETON et J. PANTALÉON. Or, ce traitement, loin d'empêcher la précipitation paraît même l'accélérer. L'action du

(*) J. DESBORDES (68) propose une hypothèse fondée sur les modifications du rapport $\frac{\text{albumine}}{\text{globuline}}$ pour expliquer la précipitation de cholestérol dans les liquides d'épanchement vieillis.

chauffage est, en réalité, multiple, provoquant des modifications dans la structure macro-moléculaire des protéines et des cénapses et il ne faudrait pas conclure trop hâtivement que les réactions diastasiques n'ont aucun rôle dans les phénomènes observés.

Mais étant donné que le sérum n'est pas placé dans les conditions optimales d'action de ces diastases, on peut imaginer la possibilité d'une évolution spontanée lente où l'intégrité des systèmes diastasiques ne serait pas nécessaire.

Le rôle du calcium dans la précipitation est certain : les expériences de G. BERTRAND nous ont appris que l'élimination des ions Ca^{++} par de l'oxalate prévenait la précipitation ultérieure des constituants du sérum au cours du vieillissement.

Ce rôle du calcium peut être une activation du système diastatique, le calcium étant envisagé comme une codiastase. Mais son rôle est aussi celui d'un acteur participant à la réaction de précipitation, puisqu'il représente le cation précipitable. On comprend que son élimination soit suffisante pour empêcher toute précipitation.

Ces remarques peuvent permettre de proposer une autre hypothèse :

On connaît le rôle de l'acide citrique dans la neutralisation des ions calcium : il suffit d'ajouter un peu de citrate à une solution de sels de calcium pour l'empêcher de précipiter par ses réactifs habituels. Si nous répétons une expérience analogue à celle d'ADLER en présence de citrate, la précipitation ne se produit plus (66).

Nous avons constaté que l'adjonction de citrate à du sérum normal empêche celui-ci de se troubler par addition de phosphates. Nous avons vérifié aussi que le citrate inhibe la précipitation des savons de calcium. De plus, l'addition de citrate au sérum vieilli contenant le précipité en suspension, permet de dissoudre la majeure partie du précipité, ne laissant insoluble que la partie amorphe protéinique dénaturée.

Le sérum contient normalement une petite quantité de citrate (15 à 40 mg par litre) (8). Il est possible que la présence de ce sel soit responsable de la solubilisation des constituants du sérum. Sa disparition pourrait rendre compte de la précipitation des sels de calcium. En fait, le taux des citrates (*) dans les sérums vieillis est relativement faible (inférieur à 15 mg par litre).

En conclusion, parmi toutes les hypothèses que nous avons envisagées, nous n'en rejetons aucune. Elles peuvent toutes, à des titres divers, participer à l'explication des phénomènes observés : la dénaturation ou les transformations de protéines, les modifications des liaisons au sein des cénapses, l'apparition de phosphates libres à partir de composés organiques, la présence de diastases dans le sérum et le rôle des sels de calcium sont des faits qui concourent tous au résultat complexe qu'est le vieillissement du sérum.

(*) Dosé, après transformation, en pentabromacétone, par colorimétrie du bromure en présence d' AuCl_3 (65).

LES DÉGÉNÉRESCENCES LIPIDOCALCIQUES

Soulignons les analogies existant entre le vieillissement du sérum et les processus physiologiques ou pathologiques de calcification et de dégénérescence.

Les hypothèses actuelles sur la formation de la substance osseuse font appel aux mêmes réactions : décomposition enzymatique d'esters phosphoriques, libération d'ions dans un milieu saturé.

L'adipocire, processus de dégénérescence des cadavres en milieu aqueux, nous donne aussi un exemple d'apparition fermentaire de sels de calcium d'acides gras saturés imprégnant tous les tissus.

Parmi les multiples formes d'artériosclérose, les infiltrations athéromateuses jouent un rôle important (26) ; et, depuis le début de ce siècle, on a cherché à en expliquer la nature et l'origine. Il ressort des travaux d'ASCHOFF (3), de KLOTZ (29), de WINDAUS (60), de WELLS (59), de SCHOENHEIMER (51), de WEINHOUSE et HIRSCH (51), de PAGE (44), etc., que cette infiltration est chimiquement constituée d'esters de cholestérol, de savons, d'autres lipides en moindre quantité et de sels de calcium. Si, dans les athéromes jeunes la présence de savons de calcium a été niée (BALDAUF) (5), leur existence dans les athéromes calcifiés ne fait pas de doute. D'ailleurs, on peut mettre sur le même plan les esters de cholestérol et les savons de calcium et, selon les organismes, il est possible que leur tendance à précipiter soit différente : le sang des herbivores contient normalement beaucoup moins de cholestérol que celui des carnivores et des omnivores. Ceci explique la facilité avec laquelle on provoque des athéroscléroses chez le lapin par l'ingestion de cholestérol, alors que le chien reste rebelle (ANITSCHKOW (2), BLOOR (12), PAGE (43)). L'artériosclérose de l'homme est surtout à base d'esters de cholestérol et le vieillissement de certains liquides humains (épanchements pleuraux ou ascitiques) s'accompagne d'une insolubilisation de cholestérol (68) ; au contraire, l'artériosclérose est rare chez les herbivores et le précipité formé au cours du vieillissement de leur sérum contient surtout des savons de calcium.

Il existe normalement dans le plasma des carnivores des substances (comme les sels biliaires) capables de maintenir en solution le cholestérol. Nous avons noté parallèlement que la présence de citrates pouvait maintenir en solution le calcium.

Cet équilibre entre cholestérol et calcium vis-à-vis des acides gras peut nous expliquer les divergences constatées entre les infiltrations athéromateuses.

Nous croyons donc une analogie possible (analogie de structure chimique et analogie dans le mécanisme de leur apparition) entre le précipité qui se forme dans le sérum et les infiltrations lipidocalciques des dégénérescences athéromateuses.

A part certains facteurs indubitables de prédisposition locale des vaisseaux, l'origine de l'infiltration nous paraît devoir être cherchée dans l'aptitude de certains constituants sanguins à se déposer. On sait que l'hyperlipidémie et l'augmentation du taux des acides gras peuvent être des facteurs d'artérios-

clérose. Mais il nous semble que d'autres facteurs, comme la diminution du taux des citrates, des pyrophosphates (66), ou de celui des substances dissolvant le cholestérol peuvent aussi concourir au même résultat.

Nous croyons enfin, (comme le fait HUEPER) (27), que l'addition au plasma (par ingestion ou mieux par injection) de ces substances dissolvantes est capable de prévenir cette infiltration. HUEPER a montré l'influence de détergents synthétiques, dont on connaît l'aptitude à dissoudre le cholestérol, sur l'apparition de l'artériosclérose expérimentale du lapin.

Le problème de la constitution du dépôt, qui se forme au cours du vieillissement des ampoules de sérum, nous conduit ainsi jusqu'aux horizons d'une thérapeutique préventive des athéromes. Et l'on pressent tout l'intérêt que pourrait avoir la poursuite de ces travaux en vue de déterminer la nature des substances les mieux adaptées à cette prévention (citrates, sels biliaires, détergents anioniques ou cationiques...), la meilleure voie d'introduction ainsi que les doses et les formes optimales de cette médication.

(Institut Pasteur de Paris, Service du Professeur M. MACHEBŒUF).

BIBLIOGRAPHIE

1. ADLER (H.-M.). — *J. of Amer. Assoc.*, 1908, 2, 752. — 2. ANITSCHKOW (N.). — *Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Pathol.*, 1913, 56, 379. — 3. ASCHOFF (L.). — *Beih. z. med. Klin.*, 1908, 55, 1; *Virchows Arch. f. path. Anat.*, 1921, 235, 152; « *Lectures on Pathology* », New-York, 1924, Hoeber, éd. — 4. BACHER (S.). — *Immunit. Zeitschr.*, 1924, 41, 360. — 5. BALDAUF (L. K.). — *J. Med. Res.*, 1906, 15, 355. — 6. BECHHOLD (H.). — *Kolloide in Biologie und Medizin*. Dresden, 1935, Steinkopff, éd. — 7. BELL (R.-D.) et DOISY (E.-A.). — *J. Biol. Chem.*, 1931, 92, 135. — 8. BENNI (B.), SCHERSTEN (B.) et OESTBERG (O.). — *Bioch. Z.*, 1930, 223, 443. — 9. BERTRAND (G.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1948 (sous presse). Pli cacheté présenté à l'Académie des Sciences, 1944, 21. — 10. BERTRAND (G.) et AGULHON (H.). — *Bull. Soc. Chim.*, 1910, 4^e série, 7, 90. — 11. BERTRAND (G.) et AGULHON (H.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 157, 1.433. — 12. BLOOR (W. R.). — *J. Biol. Chem.*, 1921, 49, 201. — 13. BRETON (A.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 98, 1.429. — 14. BRIGGS (A. P.). — *J. Biol. Chem.*, 1922, 53, 13. — 15. BROcq-ROUSSEU (D.) et ROUSSEL (G.). — « *Le Sérum Normal* », Paris, 1933, Masson, éd. — 16. BUGLIA (G.). — *Arch. di Fisiologia*, 1906, 4, 56. — 17. BUGLIA (G.) et POLIMANTI (O.). — 18. CHARGAFF (E.). — *H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1931, 199, 221. — 19. CHERBULIEZ (E.). — Communication inédite. *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 11 (en cours d'impression). — 20. DELAGE (B.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1936, 18, 1.304. — 21. DOURIS (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1918, 167, 738. — 22. DOURIS (R.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1919, 168, 249. — 23. DUCLAUX (J.). — *Thèse de doctorat ès sciences*, Paris, 1904. — 24. FAVARGER (P.). — *Schweitz. Med. Woch.*, 1946, 76, 1.342. — 25. HENRI (V.). — *Semaine Médicale*, Sept. 1907. — 26. HUEPER (W. C.). — *Biol. Symp.*, 1945, 11, 1. — 27. HUEPER (W. C.). — *Arch. Pathol.*, 1944, 38, 381. — 28. KHABAS (I. M.). — *Arch. Sc. Biol. URSS*, 1936, 41, 167. — 29. KLOTZ (O.). — *J. Exp. Méd.*, 1905, 7, 633. — 30. KOPACZEWSKI (W.) et SZUKIEWICZ (W.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1927, 184, 1.443. — 31. KOPACZEWSKI (W.). — *Protoplasma*, 1938, 30, 291. — 32. KOPACZEWSKI (W.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 226, 1.320. — 33. LE BRETON (E.) et PANTALÉON (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 36; 38. — 34. LE BRETON (E.) et PANTALÉON (J.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1947, 7, 111. — 35. LECOMTE DU NOUY (P.). — *Equilibres superficiels des solutions colloïdales*. Paris, 1929, Masson, éd. — 36. MACHEBŒUF (M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, 464. — *Thèse de doctorat ès sciences*. Paris, 1928. — 37. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J.-L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, 24, 296. — 38. MACHEBŒUF (M.) et DELSAL (J.-L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, 25, 116. — 39. MARFORI (L.). — *Biochim. terap. sper.*, 1938, 25, 116; *Tesi Clinica Medica*, Roma, 1936. — 40. MOUSSERON (M.) et HUC (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 132, 151. — 41. MUTZENBECHER (P. von). — *Bioch. Z.*, 1933, 266, 226. — 42. OKER-BLOM (M.). — *Pflügers Arch.* 1900, 79, 510. — 43. PAGE (I. H.). — *Biol. Symp.*, 1945, 11, 43. — 44. PAGE (I. H.). — *Anr. Int. Med.*, 1941, 14, 1.741. — 45. POLONOVSKI (J.), FAURE (M.) et MACHEBŒUF (M.). — *C. R. Ac. Sc.*, 10-7-1944, 218 (pli cacheté à l'Académie des Sciences); *C. R. Ac. Sc.*, 1948, 227, 1.420. — 46. ROCASOLANO (A. de Grégorio). — *Koll. Beih.*, 1917, 19, 441. — 47. ROCHE (A.) et BRACCO (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, 16, 1.479. — 48. ROCHE (A.) et MARQUET (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 119, 1.147. — 49. ROCHE (J.) et COURTOIS (J.). — *Exp. Ann. Bioch. Méd.*, 1944, 4, 219-268. — 50. SALÉN (E.). — *Studien über die Kältehämoglobinurie*, Stockholm, 1925, cité par H. BECHHOLD (6), 346. — 51. SCHÖENHEIMER (R.). — *H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1928, 177, 143. — 52. SCERENSEN (M.). — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1925, 15, 1. — 53. SPERRY (W. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1935, 111, 467. — 54.

SPERRY (W. M.) et STOYANOFF (V. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1938, 126, 77. — 55.
TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, 130, 1.029. — 56. TAYEAU (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1944, 138, 423. — 57. VERNES (A.). — *C. R. Ac. Sc.*, 1918, 166, 577. — 58. WEINHOUSE (S.) et HIRSCH (E.-F.). — *Arch. Path.*, 1940, 30, 856. — 59. WELLS (H. G.). — *Arch. Int. Méd.*, 1911, 7, 721. — 60. WINDAUS (A.). — *H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem.*, 1910, 67, 174. — 61. FAURE (M.). — In J. LOISELEUR : *Techniques de Laboratoire*, Paris, 1947, Masson, éd., p. 527. — 62. PETSCHACHER (L.). — *Zeitschr. f. ges. exper. Med.*, 1925, 47, 348. — 63. TAYEAU (F.). — *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1945, 83, 62 ; 89. — 64. BERGAUER (V.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1928, 10, 576. — 65. DESASSIS (A.) et MACHEBEUF (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, 76, 6. — 66. — KUYPER (A.-C.). — *J. Biol. Chem.*, 1945 159, 411 et 417. — 67. DESBORDES (J.). — *Ann. Biol. Clin.*, 1943, 6, 167. — 68. DESBORDES (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, 127, 784 ; 869.

Vu et permis d'imprimer :

Le recteur de l'Académie de Paris :

SARRAILH.

Vu. Le Doyen de la Faculté de Médecine :

LÉON BINET.

Vu. Le Président de Thèse :

LÉON BINET.

